

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Staphylococcus aureus

2.1.1 Klasifikasi

Dari Rosenbach (1884), klasifikasi bakteri *S.aureus* yaitu :

Domain : *Bacteria*

Kingdom : *Eubacteria*

Phylum : *Firmicutes*

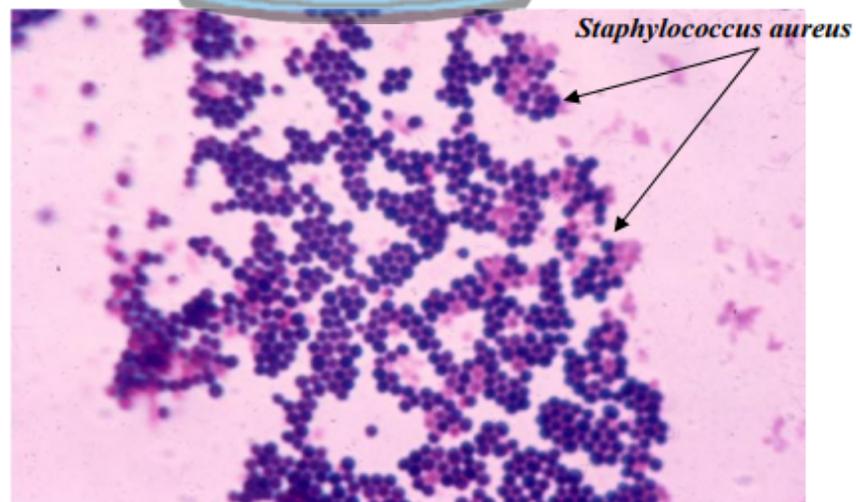
Class : *Bacilli*

Order : *Bacilalles*

Family : *Staphylococceae*

Genus : *Staphylococcus*

Spesies : *Staphylococcus aureus*



Gambar 1. *S.aureus* perbesaran 1000x (Todar, 2009)

2.1.2 Morfologi

Bakteri *Staphylococcus aureus* berasal dari kata *staphyle* yang berarti kelompok buah anggur, *coccus* yang berarti bulat serta *aureus* yang berarti keemasan. *S.aureus* merupakan bakteri gram positif anaerobik fakultatif, yang berbentuk bulat (*coccus*), membentuk pigmen kuning keemasan pada media agar darah sehingga sering juga disebut 'staph emas', non motil, tidak berspora, berdiameter 0,7-1,2 μm , tersusun dalam bentuk bergerombol seperti buah anggur dan tumbuh optimal pada suhu 35-37°C, menghasilkan koagulase, serta memfermentasi *glukosa* dan *manitol*. Bakteri ini dapat tumbuh pada pH optimum sekitar 7,0-7,5 (Pangaribuan, 2017; Anonim, 2014).

Bakteri *S.aureus* berkembang biak dengan cara pembelahan biner, dimana dua anakan sel tidak terpisah secara sempurna sehingga terlihat seperti membentuk koloni kluster seperti anggur. Diperkirakan sekitar 50% individu dewasa merupakan *carrier S.aureus*, sehingga keberadaan *S.aureus* pada saluran pernapasan atas dan kulit pada individu sehat jarang menyebabkan penyakit. *S.aureus* hidup sebagai saprofit didalam saluran pengeluaran lendir dari tubuh manusia seperti hidung, mulut, dan tenggorokan, dan dapat dikeluarkan pada saat batuk atau bersin. *S.aureus* juga terdapat pada pori-pori dan permukaan kulit kelenjar keringat dan saluran usus. *S.aureus* merupakan flora normal pada kulit sehat dan dapat menjadi patogen atau infeksi serius ketika sistem imun melemah yang dikarenakan oleh perubahan hormon, penyakit, jaringan kulit yang terbuka atau luka, penggunaan steroid atau obat yang mempengaruhi imunitas. Bakteri *S.aureus* dapat ditularkan antarmanusia melalui kontak langsung dengan kulit

yang terinfeksi maupun transmisi melalui udara (Syahrurachman *et al.*, 2010; Pangaribuan, 2017).

2.1.3 Patogenesis

Infeksi yang disebabkan oleh kemampuan suatu mikroorganisme patogenik tidak hanya dipengaruhi oleh sifat mikroba, tetapi juga dipengaruhi oleh kemampuan inang dalam menahan infeksi atau membentuk kekebalan (Pelchzar, 2012). Kemampuan mikroba dalam menyebabkan infeksi tersebut disebut virulensi, sedangkan komponen pada mikroba yang dapat meningkatkan patogenitas disebut faktor virulensi. Faktor virulensi yang potensial banyak dimiliki oleh *S.aureus*. Faktor-faktor tersebut memiliki banyak fungsi dalam patogenesis dan beberapa faktor juga dapat memiliki fungsi yang sama. Faktor virulensi *S.aureus* terdiri atas antigen (*capsule* dan *adhesins*), enzim (*coagulase*, *lipase*, *hyaluronidase*, *staphylokinase*, dan *nuclease*) yang memudahkan bakteri untuk masuk dan menghancurkan jaringan serta menyebar ke jaringan sekitarnya selama proses infeksi, serta sebanyak 7 toksin yaitu α -toksin, β -toksin, δ -toksin, P-V Leukocidin, enterotoksin, exfoliatif toksin, dan *toxic shock syndrome toxin* (TSST) (Yarwood *et al*, 2002; Afifurrahman, dkk 2014).

2.1.4 Antibiotik dan Resistensi *S.aureus*

Antibiotik merupakan sekelompok senyawa atau obat yang digunakan untuk membasmi infeksi mikroba pada manusia dan harus memiliki sifat toksisitas yang selektif. Cara kerja antibiotik yakni dengan menghambat pertumbuhan bakteri (bakteriostatik) atau menyebabkan kematian bakteri (bakterisidal) (Sulistiyaningsih 2007; Iswara 2015). Antibiotik biasanya diberikan

pada manusia dan hewan untuk pengobatan dan kontrol atas infeksi yang disebabkan oleh bakteri (Tabatabaei *et al*, 2010). Idealnya antibiotik harus memiliki toksisitas yang selektif terhadap bakteri tetapi tidak berbahaya bagi hospes. Penggunaan antibiotik yang tidak relatif tinggi dalam pengobatan akan menimbulkan resistensi bakteri terhadap antibiotik.

Resistensi bakteri terhadap antibiotik berdampak pada morbiditas dan mortalitas, juga memberi dampak negatif terhadap ekonomi dan sosial yang sangat tinggi. Pada awalnya resistensi terjadi di tingkat rumah sakit, tetapi lambat laun juga berkembang di lingkungan masyarakat, khususnya *Streptococcus pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, dan *Escherichia coli*. Bakteri resisten antibiotik tersebut terjadi akibat penggunaan antibiotik yang tidak bijak dan penerapan kewaspadaan standar (*standard precaution*) yang tidak benar di fasilitas pelayanan kesehatan (Kemenkes RI, 2011).

Menurut Jawetz 2005, mekanisme kerja antibiotik yakni dengan menghambat sintesa dinding sel yang digunakan untuk melindungi membran protoplasma yang berada dibawah dinding sel terhadap taruma. Trauma pada dinding sel (misalnya oleh lisozim) atau hambatan pembentukannya dapat menyebabkan lisisnya sel bakteri, sehingga zat-zat yang mampu merusak dinding sel bakteri akan menyebabkan bakteri mati atau terhambat pertumbuhannya; menghambat fungsi membran sel yang apabila integritas fungsi membran sitoplasma terganggu, makromolekul dan ion akan lolos dari sel, sehingga membran sel rusak dan terjadi kematian sel; menghambat sintesa protein didalam ribosom pada proses transkripsi DNA menjadi mRNA lalu ditranslasi menjadi

protein yang dihambat oleh antibiotik; menghambat sintesa asam nukleat yang dikarenakan beberapa antibiotik dapat merusak fungsi dan struktur, sehingga zat yang mengganggu struktur DNA akan mempengaruhi seluruh fase pertumbuhan bakteri.

2.2 *Multi Drug Resistant*

Penggunaan berbagai macam antibiotika yang tersedia dengan pemakaian antibiotik yang tidak tepat dosis, pemakaian dosis yang tidak tepat diagnosis, serta pemakaian dosis yang tidak tepat terhadap bakteri penyebabnya telah memunculkan berbagai jenis bakteri yang resistant terhadap lebih dari 1 jenis antibiotika atau yang disebut dengan MDR (*Multi Drug Resistance*). MDR adalah suatu keadaan di mana bakteri resisten terhadap minimal satu jenis antibiotik dari ≥ 3 golongan antibiotik (Permenkes, 2011; Maharani, 2015). *Multidrug-resistant organisms* (MDRO) adalah mikroorganisme, terutama bakteri yang mengalami MDR. Beberapa MDRO antara lain yakni MRSA (*methicillin resistant S.aureus*), *vancomycin resistant enterococci*, *extended spectrum beta laktamase gram negatif basil* (ESBLs), *multidrug-resistant Streptococcus pneumoniae* (MDRSP), *carbapenem-resistant Enterobacteriaceae* (CRE), dan *multidrug-resistant Acinetobacter*. Saat ini resistensi antibiotik merupakan masalah global, data pada tahun 2009, Indonesia menduduki peringkat ke 8 dari 27 negara dengan predikat *multidrug resistant* tertinggi di dunia (Estiningsih, 2016). Berdasarkan penelitian yang dilakukan oleh Mardiasuti (2007) dalam Estiningsih (2016), menunjukkan adanya peningkatan resistensi beberapa bakteri patogen terhadap antibiotik baik di Indonesia maupun di beberapa negara lainnya di dunia.

2.3 Gentamisin

Gentamisin merupakan antibiotik golongan aminoglikosida yang efektif terhadap bakteri *Pseudomonas aeruginosa* dan *Enterobacter sp.* Semua golongan aminoglikosida bersifat bakterisida yang berarti dapat membunuh bakteri. Aminoglikosida tidak diserap melalui saluran cerna, sehingga harus diberikan secara parenteral (dengan suntikan dibawah atau melalui kulit) pada infeksi sistemik. Ekskresi antibiotik ini melalui ginjal dan terjadi akumulasi pada gangguan fungsi ginjal (Badan POM RI, 2008).

Pada konsentrasi 0,5-5 μ g/ml, gentamisin bersifat bakterisidal terhadap banyak penyakit bakteri gram positif dan gram negatif, termasuk strain *Proteus*, *Serratia*, dan *Pseudomonas*. Gentamisin tidak efektif terhadap *Streptococcus* dan *Bacteroides*. Gentamisin bersifat toksik, terutama bila fungsi ginjal terganggu. Gentamisin sulfat 0,1% digunakan secara lokal dalam krim pada infeksi luka bakar atau luka biasa. Krim ini cenderung menyebabkan bakteri resisten gentamisin (Jawetz *et al.*, 1996). Berdasarkan pedoman pemilihan antibiotik pada pusat informasi obat nasional BPOM RI, penggunaan gentamisin bersamaan dengan antibiotik lainnya digunakan untuk mengobati infeksi kardiovaskular dan sepsis dengan penyebabnya yakni bakteri *S.aureus* (Anonim, 2014).

2.4 Gen *aminoglycosidemodifying enzymes* (AMEs)

Resistensi bakteri pada isolat klinis yang dikarenakan adanya modifikasi obat secara enzimatis, banyak ditemukan terhadap antibiotik β laktam, kloramfenikol, dan aminoglikosida (Sjahrurachman, 1996). Antibiotik aminoglikosida termasuk kedalam golongan kompleks senyawa yang dicirikan

memiliki inti *aminocyclitol* (*streptamin*, *2-deoksistretamin*, atau *streptidin*) yang terkait dengan gula amino melalui ikatan glikosidik. Aminoglikosida terutama digunakan dalam pengobatan infeksi yang disebabkan oleh bakteri aerobik gram negatif, stafilokokus, dan gram positif lainnya (Remirez *et al.*, 2010).

Aminoglikosida merupakan salah satu kelas antibiotik yang berperan penting dalam terapi infeksi yang serius, meskipun adanya laporan peningkatan resistensi terhadap obat ini banyak terdapat pada negara di Eropa (Hauschild, 2008). Mekanisme utama resistensi aminoglikosida yakni dengan menginaktivasi obat oleh *aminoglycosidemodifying enzymes* (AMEs) yang dikodekan oleh gen yang terletak pada plasmid atau transposon. Enzim yang memodifikasi aminoglikosida dapat dibagi menjadi 4 golongan yakni : *asetiltransferase* (AAC), *fosfotransferase* (APH), *nucleotidyltransferases* (ANTs), dan *adeniltransferase* (AADs). Enzim yang paling penting yang memberi perlawanan terhadap aminoglikosida di antara isolat stafilokokus adalah *aminoglycoside-6'-N-acetyltransferase/2''-O-phosphoryltransferase* [AAC(6')/APH(2'')], *aminoglycoside-4'-Onucleotidyltransferase I* [ANT(4')-I] dan *aminoglycoside-3'-O- phosphoryltransferase III* [APH(3')-III] (Hauschild *et al.*, 2008; Khoramrooz *et al.*, 2017).

Mekanisme penghambatan pada sintesis protein aminoglikosida ini berikatan dengan subunit 30S ribosom bakteri atau beberapa terikat pada subunit 50S ribosom bakteri serta menghambat translokasi peptidil-tRNA dari situs A ke situs P sehingga menyebabkan kesalahan pembacaan mRNA dan mengakibatkan bakteri tidak mampu menyintesis protein vital untuk pertumbuhannya dan

menyebabkan kematian bakteri. (Afifah, 2017). Resistensi kromosom bakteri terhadap aminoglikosida pada dasarnya terjadi karena tidak ada reseptor protein khusus pada subunit 30S dari ribosom. Resistensi yang bergantung plasmid terhadap aminoglikosida tergantung pada pembentukan enzim *adenilase*, *fosforilase*, atau *asetilase* oleh mikroorganisme yang dapat merusak obat-obat tersebut. Resistensi terjadi dikarenakan kerusakan permeabilitas, perubahan membran luar yang menyebabkan berkurangnya pengangkutan aktif aminoglikosida ke dalam sel sehingga obat tidak dapat mencapai ribosom, yang sering kali hal ini terjadi melalui perantara plasmid (Jawetz *et al.*, 1996).

2.5 Gen *acetyltransferases* (*aac*)

S.aureus telah menunjukkan penolakan terhadap berbagai kelas antibiotik yang menyebabkan sulitnya pengobatan infeksi. Aminoglikosida dengan menghambat sintesis protein bakteri menunjukkan aktivitas bakterisida. Kelompok antibiotik ini terutama *gentamisin* dan *tobramycin* yang dikombinasikan dengan antibiotik *beta-laktam* atau *glikopeptida* memiliki efek sinergis terhadap pengobatan infeksi *S. aureus*, terutama endokarditis. Perlawanan terhadap *gentamisin* dan resistensi resisten terhadap *tobramycin* dan *kanamisin* pada stafilokokus dimediasi oleh enzim bifungsional yang menampilkan aktivitas AAC (6') dan APH (2') yang dikodekan oleh gen *aac(6')-Ie-aph(2'')-I*. Reaksi PCR gen *aac(6')-Ie-aph(2'')-I* menggunakan design primer *forward* (5'-CAGGAATTTATCGAAAATGGTAGAAAAG-3') dan primer *Reverse* (5'-CACAATCGACTAAAGAGTACCAATC-3') dengan hasil produk PCR 369 bp (Khoramrooz *et al.*, 2017). Sebagai resistensi aminoglikosida dan distribusi gen

yang mengkodekan enzim modifikasi, aminoglikosida belum dikarakterisasi dengan baik atau didokumentasikan dalam koleksi besar *S. aureus* (Hauschild *et al.*, 2008).

2.6 Polymerase Chain Reaction (PCR)

2.6.1 Pengertian

Polymerase Chain Reaction atau PCR merupakan suatu metode enzimatik untuk amplifikasi DNA dengan cara *in vitro*. Beberapa komponen utama yang diperlukan dalam proses PCR, yakni DNA cetakan, yaitu fragmen DNA yang akan dilipatgandakan; oligonukleotida primer, yaitu suatu sekuens oligonukleotida pendek (15-25 basa nukleotida) yang digunakan untuk mengawali sintesis rantai DNA; deoksiribonukleotida trifosfat (dNTP) terdiri dari dATP, dCTP, dGTP, dTTP; enzim DNA polimerase yaitu enzim yang melakukan katalisis reaksi sintesis rantai DNA, serta komponen pendukung lain seperti senyawa buffer PCR, dan magnesium klorida ($MgCl_2$) (Yusuf, 2010; Yuwono, 2006).

Keunggulan dari metode PCR didasarkan pada spesifitas, efisiensi, dan keakuratan. Spesifitas PCR terletak pada kemampuannya mengamplifikasi sehingga menghasilkan produk melalui sejumlah siklus. Keakuratan yang tinggi dikarenakan DNA polimerase yang mampu menghindari kesalahan pada amplifikasi produk. Selain itu kelebihan lain metode PCR dapat diperoleh pelipatgandaan suatu fragmen DNA (110 bp, 5×10^{-9} mol) sebesar 200.000 kali setelah dilakukan 20 siklus reaksi selama 220 menit. Reaksi ini dilakukan dengan menggunakan komponen dalam jumlah sangat sedikit. DNA cetakan yang digunakan juga tidak perlu dimurnikan terlebih dahulu sehingga metode PCR

dapat digunakan untuk melipatgandakan suatu sekuen DNA dalam genom bakteri hanya dengan mencampurkan kultur bakteri di dalam tabung PCR (Yusuf, 2010).

Pemilihan primer yang tepat merupakan faktor penting yang mempengaruhi kualitas deteksi molekuler berbasis PCR. Primer PCR merupakan oligonukleotida yang berperan untuk mengawali proses amplifikasi molekul DNA. Analisis PCR dengan primer spesifik merupakan langkah terbaik untuk kepentingan deteksi bakteri patogen karena dapat menghasilkan penentuan secara cepat keberadaan gen target, cukup sensitif dan mudah digunakan dalam kegiatan rutin (Aris, 2011). Kekurangan dari metode PCR yaitu pada biayanya yang masih tergolong tinggi. Metode PCR ini juga tidak bisa membedakan DNA yang terdeteksi merupakan antigen hidup atau yang sudah mati, sehingga baik antigen yang aktif maupun pasif akan diperbanyak dalam proses ini. Pada proses PCR menggunakan sebuah alat termosiklus, yakni sebuah mesin yang memiliki kemampuan untuk memanaskan sekaligus mendinginkan tabung reaksi dan mengatur temperatur untuk tiap tahapan reaksi. (Yusuf, 2010).

Menurut Yusuf (2010), terdapat 3 tahapan penting dalam proses PCR yang selalu terulang dalam 30-40 siklus dan berlangsung dengan cepat. Banyaknya siklus amplifikasi ini tergantung pada konsentrasi DNA target dalam campuran reaksi. Pada akhir siklus akan diperoleh molekul-molekul DNA rantai ganda yang baru yang merupakan hasil polimerasi dalam jumlah yang jauh lebih banyak dibandingkan dengan jumlah DNA cetakan. Tahapan tersebut yakni :

1. Denaturasi

Denaturasi DNA merupakan proses pembukaan untai DNA ganda menjadi

DNA dengan untai tunggal. Renaturasi (membentuk DNA untai ganda lagi) terjadi ketika denaturasi tidak lengkap sehingga mengakibatkan gagalnya proses PCR. Aktifitas enzim tersebut mempunyai waktu paruh lebih dari 2 jam pada suhu 92,5°C, 40 menit pada suhu 95°C, dan 5 menit pada suhu 97,5°C. Waktu denaturasi yang terlalu lama dapat mengurangi aktifitas enzim Taq polymerase.

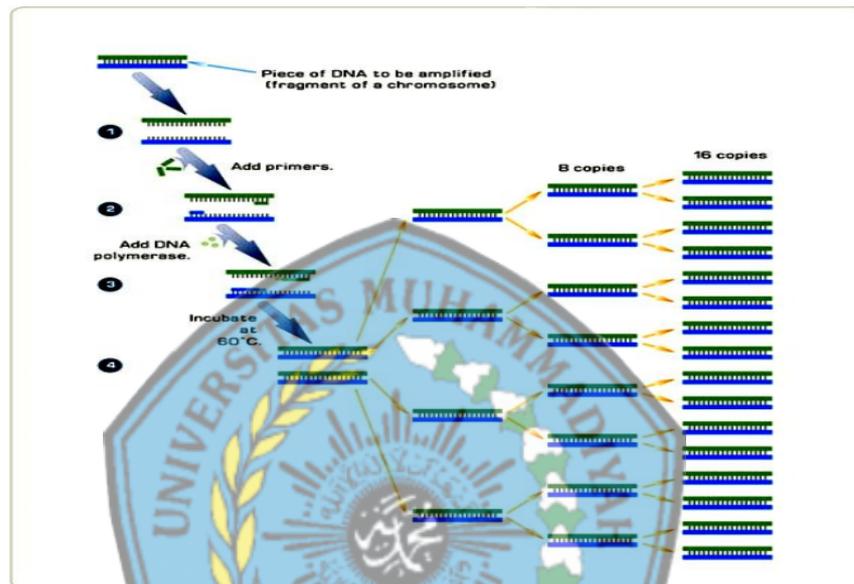
2. Annealing (penempelan primer)

Temperatur yang digunakan pada tahap ini berbeda pada masing-masing primer. Kisaran temperatur penempelan yang digunakan adalah antara 36°C - 72°C, namun suhu yang biasa dilakukan adalah antara 50 – 60°C. Temperatur yang berbeda ini disebabkan karena panjang pendeknya pasangan basa atau oligonukleotida primer yang digunakan serta adanya G-C pada primer. Semakin panjang ukuran primer, semakin tinggi temperaturnya. Kriteria yang umum digunakan untuk merancang primer yang baik adalah bahwa primer sebaiknya berukuran 18 – 25 basa, mengandung 50 – 60% G+C dan untuk kedua primer tersebut sebaiknya sama. Sekuens DNA dalam masing-masing primer itu sendiri juga sebaiknya tidak saling berkomplemen, karena hal ini akan mengakibatkan terbentuknya struktur sekunder pada primer tersebut dan mengurangi efisiensi PCR.

3. Pemanjangan Primer (Extention)

Pada tahap ini Taq polymerase memulai aktivitasnya memperpanjang DNA primer dari ujung 3' pada suhu 72°C dengan kecepatan penyusunan nukleotida oleh enzim tersebut diperkirakan 35 – 100 nukleotida/detik. Kecepatan tersebut bergantung pada buffer, pH, konsentrasi garam dan molekul DNA target.

Biasanya di akhir siklus PCR waktu yang digunakan untuk tahap ini diperpanjang sampai 5 menit sehingga seluruh produk PCR diharapkan terbentuk DNA untai ganda. Lalu pada akhir terdapat proses *cooling down* yang dilakukan pada suhu 4°C. Proses ini berfungsi untuk menstabilkan DNA sehingga DNA tidak rusak.



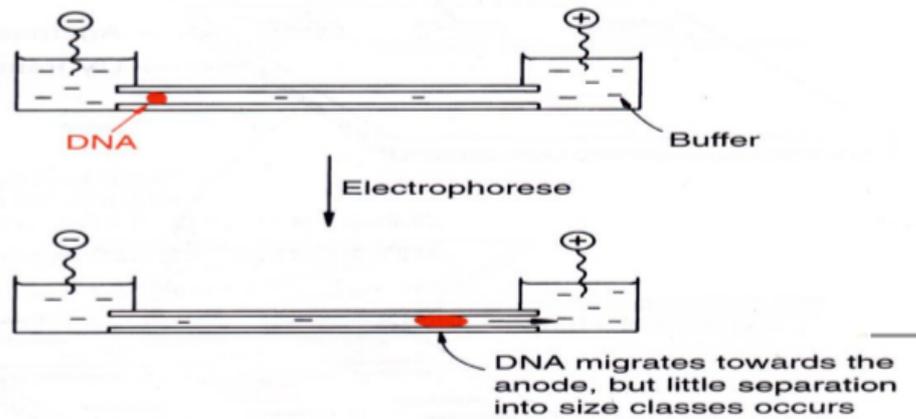
Gambar 2. Siklus PCR (1) Denaturasi pada suhu 90°–95°C; (2) Annealing pada suhu 37°–65°C; (3) Elongasi pada suhu 72°C ; (4) Siklus pertama selesai (Sumber :Yusuf 2010)

2.6.2 Elektroforesis Gel Agarosa

Elektroforesis adalah teknik yang digunakan untuk memisahkan dan memurnikan suatu makromolekul khususnya protein dan asam nukleat berdasarkan perbedaan ukuran (Magdeldin, 2012). Elektroforesis gel agarosa adalah teknik paling baik yang pernah dibuat dan digunakan secara rutin di laboratorium klinik untuk menganalisa protein dan DNA pada cairan biologis seperti serum, urin, dan CSF. Metode ini terdiri atas menginjeksi DNA ke dalam gel agarosa dan menyatukan gel tersebut dengan listrik. Hasilnya untai DNA kecil pindah dengan cepat dan untai yang besar diantara gel menunjukkan hasil positif

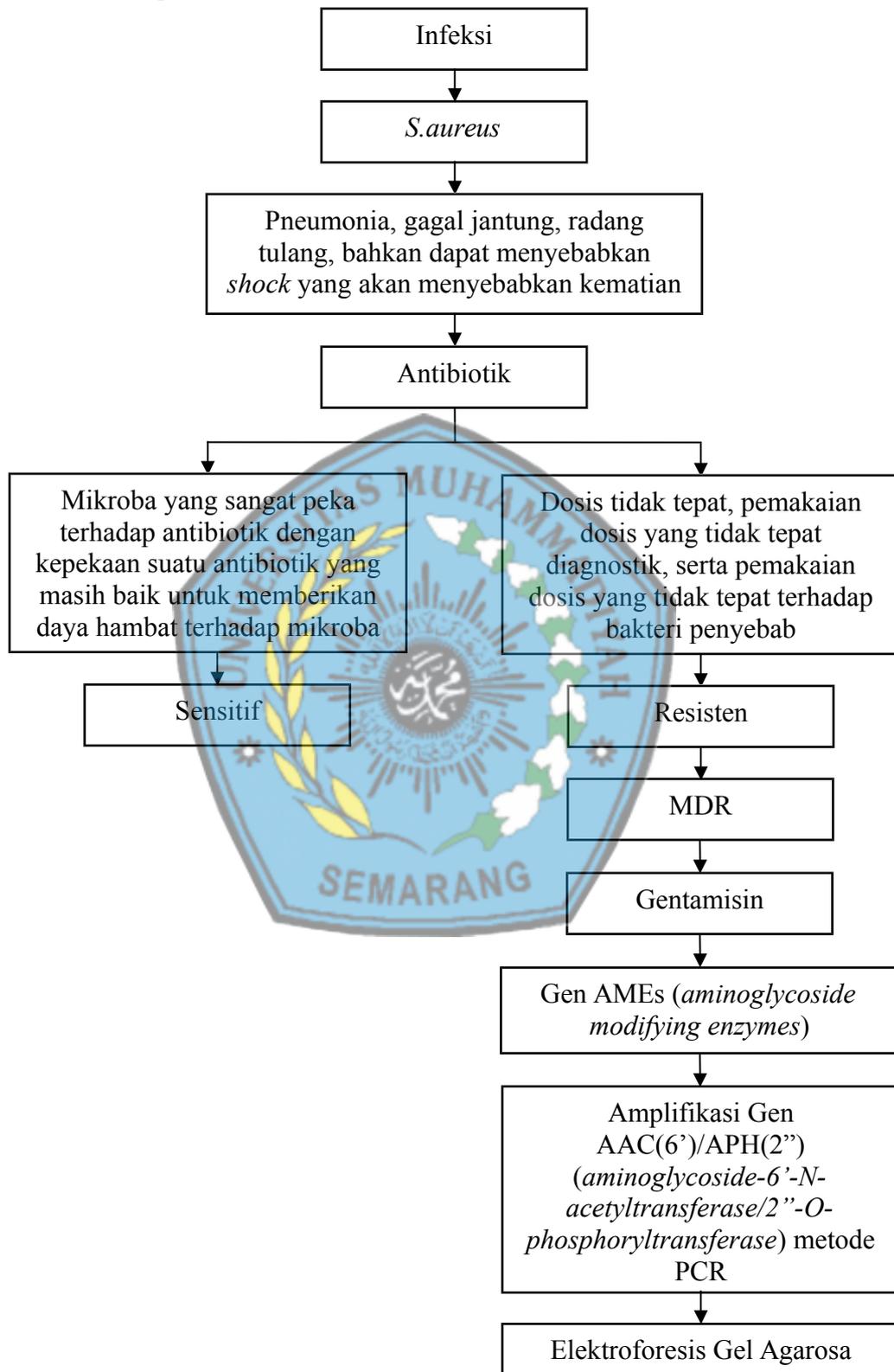
(Yusuf, 2010). Prinsip yang digunakan yakni dengan elektroforesis zona, dimana molekul protein bermigrasi pada medium padat/gel yang direndam dengan suatu larutan penyangga di bawah pengaruh medan listrik. Migrasi atau pergerakan DNA ini tergantung pada konsentrasi agarosa dalam gel, muatan listrik, titik isoelektrik bersih dan massa molekul protein (Giot, 2010). Molekul yang bermuatan negatif (anion) akan bergerak menuju kutub positif (anoda), sedangkan molekul yang bermuatan positif (kation) akan bergerak menuju kutub negatif (katoda) (Nurhayati dan Darmawati, 2017).

Molekul DNA akan bermigrasi melalui pori-pori kecil yang terbentuk dalam padatan gel agarosa. Molekul yang lebih besar akan bergerak lebih cepat dan bermigrasi lebih jauh dari molekul kecil karena memiliki gesekan yang lebih rendah saat bergerak menuju elektroda positif. Konsentrasi yang rendah pada gel agarosa memberikan resolusi yang lebih baik untuk fragmen besar, dengan memberikan pemisahan yang lebih besar antara band yang secara ukuran tidak terlalu jauh berbeda. Konsentrasi gel yang lebih tinggi dapat mengurangi kecepatan migrasi fragmen panjang yang sementara itu dapat memfasilitasi pemisahan yang lebih baik pada fragmen DNA kecil (Lee dan Bhaman, 2010).

(a) Standard electrophoresis**(b) Gel electrophoresis**

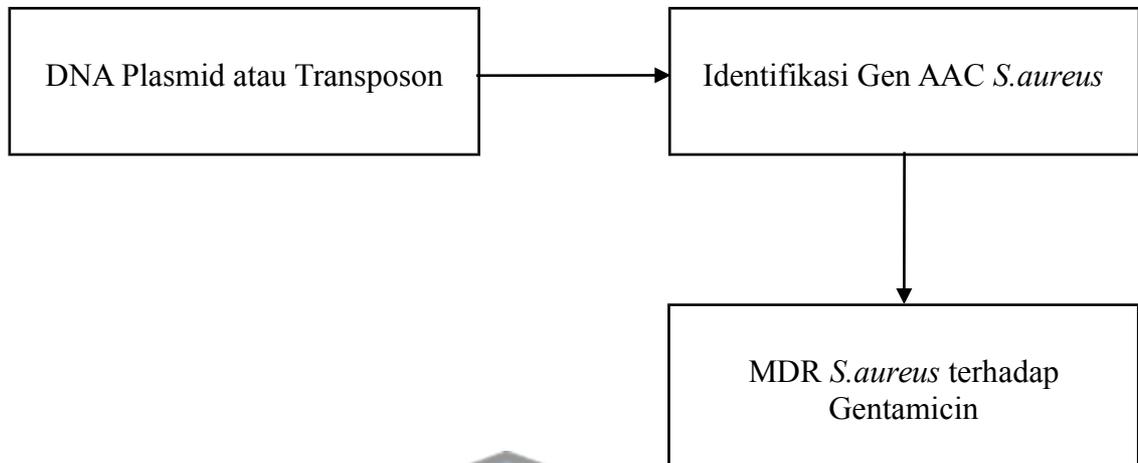
Gambar 3. Metode elektroforesis (Sumber : Yusuf 2010)

2.7 Kerangka Teori



Gambar 4. Kerangka Teori

2.8 Kerangka Konsep



Gambar 5. Kerangka Konsep

